

#7  
jc864 u.s.s. pto  
09/648196



08/25/00



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Industrial  
Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 1999년 제 59776 호  
Application Number

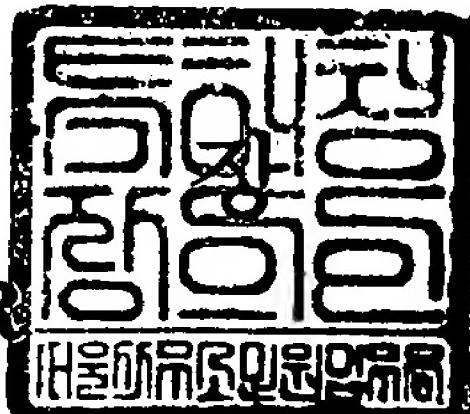
출 원 년 월 일 : 1999년 12월 21일  
Date of Application

출 원 인 : 주식회사 엘지화학  
Applicant(s)



2000 년 07 월 13 일

특 허 청  
COMMISSIONER



【서류명】 특허출원서  
【권리구분】 특허  
【수신처】 특허청장  
【제출일자】 1999.12.21  
【발명의 명칭】 항원을 포함하는 고체상 미세입자 및 이를 포함하는 제제  
【발명의 영문명칭】 SOLID MICROPARTICLE COMPRISING ANTIGEN AND PREPARATION  
COMPRISING SAME  
【출원인】  
【명칭】 주식회사 엘지화학  
【출원인코드】 1-1998-001275-0  
【대리인】  
【성명】 이현실  
【대리인코드】 9-1999-000366-5  
【포괄위임등록번호】 1999-064250-8  
【대리인】  
【성명】 장성구  
【대리인코드】 9-1998-000514-8  
【포괄위임등록번호】 1999-064247-1  
【발명자】  
【성명의 국문표기】 김명진  
【성명의 영문표기】 KIM, Myung Jin  
【주민등록번호】 590110-1064013  
【우편번호】 305-503  
【주소】 대전광역시 유성구 송강동 200-4 한마을아파트 114-1001  
【국적】 KR  
【발명자】  
【성명의 국문표기】 권규찬  
【성명의 영문표기】 KWON, Kyu Chan  
【주민등록번호】 700731-1057718  
【우편번호】 305-503  
【주소】 대전광역시 유성구 송강동 199 송강그린아파트 319-1303  
【국적】 KR

1019990059776

2000/7/1

【발명자】

【성명의 국문표기】 김 준

【성명의 영문표기】 KIM, Joon

【주민등록번호】 711002-1481412

【우편번호】 305-390

【주소】 대전광역시 유성구 전민동 462-4 청구나래아파트 104-403

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인  
이현실 (인) 대리인  
장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 9 면 9,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 16 항 621,000 원

【합계】 659,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)\_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 수용성 항원의 활성을 유지하면서 항원을 체내에 효과적으로 전달하는 고체상 미세입자 및 이를 포함하는 제제에 관한 것으로, 본 발명의 미세입자는 수용성 항원을 포함하는 고체상 입자가 친유성 물질로 피복된 평균 입경 0.01 내지 200  $\mu\text{m}$  크기의 미세입자로, 이 미세입자를 비수성 용액에 분산시킨 분산액 또는 이 분산액을 주사용 수용액에 혼탁시킨 에멀젼 분산액을 주사제 및 경구 투여용 제제로 사용할 수 있다.

### 【명세서】

#### 【발명의 명칭】

항원을 포함하는 고체상 미세입자 및 이를 포함하는 제제{SOLID MICROPARTICLE COMPRISING ANTIGEN AND PREPARATION COMPRISING SAME}

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 수용성 항원의 활성을 유지하면서 항원을 체내에 효과적으로 전달하는 고체상 미세입자 및 이를 포함하는 제제에 관한 것이다.
- <2> 항원은 질병의 예방을 위한 백신으로 사용되어 왔는데, 주로 단백질로 구성되며 이러한 항원 단백질 부분이 항원 활성을 담당한다. 그러나 항원 단백질은 열, pH, 염분, 유기 용매 등에 의해 쉽게 변성되는 단점이 있다(Weiqi Lu et al. *PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, 49, 13-19(1995)). 이에 목적하는 질병 예방 효과를 얻기 위하여는 항원 단백질을 안정적이며 효과적으로 생체내에 전달할 수 있는 제형의 개발이 요구된다.
- <3> 이러한 제형의 하나로, 면역 보조제를 사용한 수용액상 백신 제형을 들 수 있는데, 예를 들면 B형 간염 백신, DTP 백신 등의 항원 단백질을 수용액상에 분산된 알럼 입자에 흡착시켜 제제화한 것이다.
- <4> 또 다른 제형으로, 생분해성 고분자로 코팅된 고체상 백신 제형을 들 수 있는데, 예를 들어 항원 단백질을 폴리에스터 계열의 폴리락타이드(polylactide), 폴리글리콜라

이드(polyglycolide), 이들의 공중합체인 폴리락타이드-코-글리콜라이드(poly(lactide-co-glycolide)), 폴리-오르토-에스터(poly-ortho-ester), 폴리안하이드라이드(polyanhydride) 등의 생분해성 고분자로 코팅하여 고체상 미세입자로 제제화한 것이다. 이 제형을 이용하여 항원이 체내에서 장기간 그 특성을 잃지 않고 효율적으로 방출되도록 하는 약물 전달 체계 기술(drug delivery system technology)이 지난 십여 년간 도입되어 많은 연구가 진행되었다.

<5> 이 제형은 약물을 체내로 미리 예정된 프로그램에 따라 방출하여 그 약물의 효과를 수주 내지 수개월 동안 지속시킬 수 있으며, 생분해성 고분자가 약물을 체내 효소의 공격으로부터 막아주고, 미세입자의 크기를 적절하게 조절함으로써 마크로파지와 같은 탐식세포들에게 탐식되게 하여 그 효과를 더 극대화할 수 있는 장점을 가진다(Langer R. et al. *Nature*, 263, 797-800 (1976); O'Hagan, D. T. et al. *Immunology*, 73, 239-242 (1991); Eldridge, J. H. et al. *Infect. Immun.* 59, 2978-2986 (1991); Esparza, I. et al. *Vaccine*, 10, 714-721 (1992); Sah, H. K. et al. *J. Control. Release*, 35, 137-144 (1995); Moldoveanu, Z. et al. *J. Infect. Dis.* 167, 84-90 (1993); Ray, R. et al. *J. Infect. Dis.* 176, 752-755 (1993); Weiqi Lu et al. *PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, 49, 13-19 (1995); Clealand JL. Et al. *Pharm Res.*, 13, 1464-1475 (1996); Soriano I. et al. *Int. J. Pharmaceutical*, 142, 135-142 (1996); 및 Lee H. K. et al. *J. Control. Rel.*, 44, 283-293 (1997)).

<6> 이러한 장점들에도 불구하고, 제제화 과정에 유기 용매의 사용으로 인해 유기 용매와 접촉한 단백질이 심하게 변성되는 문제점이 있어 실용화하는 데에 어려움이 있다 (Park T.G. et al.).

*J. Control. Rel.*, 33, 211-223 (1995)). 실제로, 이 제형에 사용되는 생분해성 고분자는 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 아세토나이트릴, 클로로포름, 아세톤과 같은 유기 용매에 대하여만 용해되는 특성을 가지므로, 제제화 과정에서 유기 용매의 사용을 완전히 배제한다는 것은 불가능하다.

- <7> 단백질과 유기 용매의 접촉을 배제하기 위해, 항원 단백질을 수용성 고분자로 1차 코팅하여 고형화하고 이 입자를 생분해성 고분자가 용해된 유기 용매에 분산시켜 최종입자를 만드는 방법을 사용함으로써 항원 단백질과 유기 용매의 직접적인 접촉을 차단시켜 유기 용매에 의한 단백질의 변성을 최소화한 시도가 있다(Lee H. K. et al. *J. Control. Rel.*, 44, 283-293 (1997); 및 미국 특허 제 5753234 호).
- <8> 한편, 항원 단백질을 사용한 5  $\mu\text{m}$  이하의 크기의 미세입자가 체내 탐식세포들에 의해 쉽게 탐식되는 성질을 이용하여, 항원 단백질을 체내 목적하는 지점까지 목표화(targeting)시킬 수 있을 것으로 기대되는데, 특히 소장의 페이어스 판(Payer's patches)까지 목표화시켜 흡수시킬 수 있다면 경구 투여용 제형도 개발할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 경구 투여용 제형의 경우, 단백질 특유의 친수성과 큰 분자량으로 인해 단백질을 페이어스 판에서 흡수를 담당하는 M 세포에 흡수시키는 데에 많은 어려움이 있는데, 소장에서의 효율적인 흡수를 위해서 살리실레이트, 혼합된 담즙-지방산 미셀(mixed bile salt-fatty acid micelles), 칠레이터(chelators), 지방산, 인지질, 아크릴카르니틴(acrylcarnitines), 계면활성제, 중쇄 글리세라이드(medium chain glycerides) 등과 같은 흡수 촉진제를 사용하는 방법이 보고된 바 있다(Lee, V. H. L.

*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*, 5, 69-97 (1988); Yoshioka, S. et al. ., 71, 593-597 (1982); Scott-Moncrieff, J. C. et al. *J. Pharm. Sci.*, 83, 1465-1469 (1994); Muranishi, S. et al. *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 1159-1163 (1977); Fix, J. A. et al. *Am. J. Physiol.* 251, G332-G340 (1986); Shao, Z. et al., 10, 243-250 (1993); Constantinides, P. P. et al. 20, 184-185 (1993); 및 Bjork, E. et al. , 2, 501-507 (1995)).

<9> 한편, 우혈청알부민을 레시틴-콜레스테롤 리포좀에 봉입(encapsulation)한 미세입자가 경구 투여된 동물의 침샘에서 IgA 반응이 증가한다는 보고도 있다(Genco, R. et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 409, 650-667 (1983)).

<10> 그러나, 현재까지 알려진 항원의 수용액상 경구 투여용 백신 제형은 장 수용체가 있는 폴리오(polio) 백신에 한하는 실정이며, 리포좀을 이용한 미세입자는 그 구조가 매우 불안정한 단점이 있고, 일부 생분해성 고분자를 이용한 미세입자 제형도 일부 동물실험에서 가능성을 보일 뿐(Challacombe, S. J. et al. *Vaccine*, 15, 169-175 (1997)) 아직 실용화되지 못한 실정이다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 따라서, 본 발명의 목적은 수용성 항원의 활성을 유지하면서 항원을 체내에 효과적으로 전달하는 고체상 미세입자를 제공하는 데 있다.

<12> 본 발명의 다른 목적은 상기 미세입자를 포함하는 제제를 제공하는 데 있다.

### 【발명의 구성 및 작용】

<13> 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 수용성 항원을 포함하는 고체상 입자가 친유성 물질로 피복된 평균 입경 0.1 내지 200  $\mu\text{m}$  크기를 갖는 고체상 미세입자를 제공한다.

<14> 다른 목적에 따라 본 발명에서는 상기 고체상 미세입자를 비수성 용액에 분산시켜 제조된 분산액 제제를 제공한다.

<15> 또한, 다른 목적에 따라 본 발명에서는 상기 분산액 제제에 주사용 수용액을 첨가하여 제조된 수중유적형 에멀젼 제제를 제공한다.

<16> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<17> 본 발명에는 수용성 항원 단백질을 단독으로 또는 수용성 부형제와 함께 고체화한 고체상 입자가 사용된다. 따라서 비수용성 부형제를 사용할 경우 반드시 필요한 유기 용매가 사용되지 않으므로 유기 용매와의 접촉에 의한 항원 단백질의 변성의 우려가 전혀 없다.

<18> 일반적으로 수용성 항원 단백질이 단독으로 또는 수용성 부형제와 함께 고체화된 고체상 입자는 물에 분산시켜 투여할 수 없는데 그 이유는 이 입자가 투여 전에 일부 또는 전부가 용해되어 효과를 상실하는 문제가 있기 때문이다. 따라서 고체상 입자는 비수성 용액에 분산하여 투여하여야 하지만 이 경우에도 수용성 단백질 입자들이 비수성 용액에 대해 친화력이 크지 않아 분산성이 불량하다는 문제점이 있다.

<19> 본 발명의 미세입자는 수용성 항원 단백질이 단독으로 또는 수용성 부형제와 함께

고체화된 고체상 입자가 친유성과 비수용성을 갖는 물질(이하 '친유성 물질'이라 함)로  
피복된 것으로, 본 발명의 미세입자는 친유성 물질로 된 표면으로 인해 식물성 기름 등  
의 비수성 용액에 분산되어 주사 또는 경구 투여 제형으로 제제화될 경우 분산성이 우수  
하여 점성이 낮으며, 수용액상에서 불안정한 항원 단백질을 사용한 경우에도 비수성 용  
액에서 안정적으로 체내에 투여될 수 있는 특징이 있다.

<20> 또한 본 발명의 미세입자는 친유성 물질로 된 표면을 가지고 있어 인지질로 된 생  
체막과 쉽게 융화되므로 항원 단백질을 보다 효율적으로 체내에 전달할 수 있으며 경구  
투여될 경우 소장의 페이어스판의 M 세포로의 이동(translocation)이 가능한 특징이 있  
다.

<21> 본 발명의 미세입자는 제조시 용매로서 물을 사용하며, 항원 단백질을 변성시킬 우  
려가 있고 잔존시 독성을 일으킬 수 있는 유기 용매를 전혀 사용하지 않는 것에 그 특징  
이 있다.

<22> 이러한 특징들을 갖는 본 발명의 미세입자에 사용될 수 있는 수용성 항원으로는,  
질병의 예방을 위한 백신으로의 사용을 목적으로 하는, 질병을 유발하는 바이러스, 세균  
및 진균로부터 유래하는 항원, 핵산 등이 있다. 바이러스로부터 유래하는 항원의 대표  
적인 예로는 아데노바이러스 타입 4&7(adenovirus types 4&7), A형 간염(hepatitis A)  
바이러스, B형 간염(hepatitis B) 바이러스, C형 간염(hepatitis C) 바이러스, 인플루엔  
자 A & B(influenza A & B) 바이러스, 일본 뇌염(Japanese encephalitis) 바이러스, 홍  
역(measles) 바이러스, 유행성 이하선염(mumps) 바이러스, 풍진(rubella) 바이러스, 소  
아마비(polio) 바이러스, 공수병(rabies) 바이러스, 수두(small pox) 바이러스, 황열  
(yellow fever) 바이러스, 인간면역결핍 바이러스(HIV) 등의 바이러스로부터 유래된 것

으로, 정제 항원, 재조합 항원, 생 바이러스, 약독화된 바이러스, 죽은 바이러스 항원 및 이들의 혼합 항원이 있다. 세균으로부터 유래하는 항원의 대표적인 예로는 보데텔리아 페투시스(*Bordetella pertussis*), 보렐리아 바그도페리(*Borrelia burgdorferi*), 장독소 대장균(*enterotoxigenic E. coli*), 헤모필러스 인플루엔자 타입 b( type b(Hib)), 마이코박테리움 레프레(*Mycobacterium leprae*), 마이코박테리움 투ber콜로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 네이세리아 메닌기티디스 A & C( A & C), 네이세리아 메닌기티디스 B(*Neisseria meningitidis* B), 쥐도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 쥐도모나스 세파시아(), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 시겔라 종(*Shigella spp.*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 비브리오 콜레라() 등의 세균으로부터 유래된 것으로, 세포 전체 또는 일부, 독소 및 이들의 혼합 항원이 있다. 또한 진균류 및 기생체로부터 유래하는 항원의 대표적인 예로는, 코키디오데스 이미티스(

*Coccidiodes immitis*), 레이쉬마니아 종(*Leishmania* sp.), 플라스모디움 종(*Plasmodium* sp.) 등의 진균류 및 기생체로부터 유래된 것으로, 병원체 전체 또는 일부 및 이들의 혼합 항원이 있다. 동물 질병의 예방을 위해 동물용 백신에 사용되는 항원의 대표적인 예로는, 소 기종저, 소 유행열, 소 탄저병, 소 아까바네병, 소 구제역, 소 유방염, 소 전염성비기관염, 소 바이러스성 설사증, 소 전염성위장염, 돼지 콜레라, 돼지 유행성설사증, 돼지 위축성비염, 돼지 파보바이러스 병, 돼지 로타바이러스성 장염, 닭 뉴캣슬병, 닭 마렉병, 닭 뇌척수염, 광견병, 개 디스템퍼, 개 파보바이러스성 장염, 개 코로나바이러스 병, 개 전염성 간염 등의 질병을 예방하기 위한 동물용 백신에 사용되는 세균성, 바이러스성, 마이코플라즈마성 항원에서 유래한 것으로 병원체 전체 또는 일부 및 이들의 혼합 항원이 있다. 또한 핵산류 항원의 대표적인 예로는 병원체에서 추출한 DNA, RNA, 플라스미드, CpG DNA 및 올리고뉴클레오타이드가 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 항원의 범위는 상기한 바와 같이 광범위한데, 이 항원의 종류에 따라 본 발명이 제공하는 미세입자는 다양하게 적용될 수 있다.

<23> 본 발명에 사용될 수 있는 친유성 물질로는, 지질 및 이의 유도체, 지방산 및 이의 유도체, 왁스 및 이들의 혼합물을 들 수 있다. 상기 지질의 대표적인 예로는 레시틴, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨 등이 있다. 상기 지질의 유도체로는 아라키도일 포스파티딜콜린 (arachidoyl phosphatidylcholine), 스테아로일 포스파티딜콜린(stearoyl phosphatidylcholine) 등이 있다. 상기 지방산의 대표적인 예로는 미리스트산(myristic acid), 팔미트산(palmitic acid), 스테아르산(stearic acid)

등이 있고, 이들의 염도 포함하며, 지방산의 유도체의 대표적인 예로는 글리세릴 스테아레이트(glyceryl stearate), 소르비탄 팔미테이트(sorbitan palmitate), 소르비탄 스테아레이트(sorbitan stearate), 소르비탄 모노올레이트(sorbitan monooleate), 폴리소르베이트(polysorbates) 등의 지방산의 에스터 유도체가 있다. 상기 왁스의 예로는 음이온성 에멀젼화 왁스(anionic emulsifying wax), 카노바 왁스(carnauba wax), 미세결정질왁스(microcrystalline wax)가 있다.

<24> 상기 수용성 항원은 미세입자 전체 중량에 대해 0.001 내지 99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 10 중량%의 양으로 사용될 수 있고, 상기 친유성 물질은 중량비로 미세입자 전체 중량에 대해 1 내지 99.999 중량%, 바람직하게는 5 내지 50 중량%의 양으로 사용될 수 있다.

<25> 또한 본 발명에서는 수용성 항원 및 친유성 물질 외에도 항원 단백질의 안정성과 항원성을 증대시킬 목적으로 수용성 항원이 포함된 고체상 입자에 수용성 부형제를 추가로 포함할 수 있는데, 이러한 수용성 부형제로는 탄수화물, 단백질, 아미노산, 지방산, 무기염, 계면활성제, 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물을 들 수 있다. 상기 탄수화물의 대표적인 예로는 하이드로프로필셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 소디움카르복시메틸셀룰로스, 히알루론산, 키토산, 알지네이트, 글루코즈, 크실로즈, 갈락토즈, 프럭토즈, 말토즈, 사카로즈, 텍스트란, 콘드로이친 설페이트와 같은 수용성 당류가 있다. 상기 단백질의 대표적인 예로는 알부민, 젤라틴이 있으며, 상기 아미노산의 대표적인 예로는 글리신, 알라닌, 글루탐산, 아르기닌, 리신 및 이들의 염의 형태가 있다. 상기 수용성 부형제는 미세입자 전체 중량에 대해 0.001 내지 99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%의 양으로 사용될 수 있다.

- <26> 본 발명의 미세입자는 수용성 항원이 포함된 고체상 입자를 친유성 물질로 피복하여 제조할 수 있다. 구체적인 방법으로는, 친유성 물질이 레시틴과 같이 계면활성을 갖는 경우에는 이 물질을 수용성 항원이 녹아 있는 수용액에 충분히 수화시킨 후 얻어진 혼합 용액을 분무 건조하여 제조할 수 있다. 이 경우에는 분무 건조시에 형성되는 수용액적의 표면에 레시틴이 고농도로 흡착됨으로써 수용 액적이 건조될 때 레시틴이 입자의 표면을 구성하게 된다. 상기 수용액에는 수용성 항원 외에 수용성 부형제를 추가로 용해시킬 수 있다.
- <27> 본 발명의 미세입자를 제조하는 다른 구체적인 방법으로는, 수용성 항원이 녹아 있는 수용액을 분무 건조 또는 동결 건조하여 수용성 항원이 포함된 고체상 입자를 제조한 후 이 입자를 친유성 물질이 용해된 에탄올에 분산시킨 다음 분무 건조하여 제조할 수 있다. 상기 수용액에는 수용성 항원 외에 수용성 부형제를 추가로 용해시킬 수 있다.
- <28> 본 발명의 방법에 의해 제조된 미세입자는 평균 입경 0.1 내지 200  $\mu\text{m}$ 의 크기이며 바람직하게는 1 내지 10  $\mu\text{m}$ 의 크기이다.
- <29> 본 발명의 미세입자는 비수성 용액에 분산시켜 분산액 제제로 제조될 수 있다. 상기 비수성 용액으로는 식용유, 미네랄 오일, 스쿠알렌, 스쿠알란, 대구 간유, 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드 및 이들의 혼합물이 있다. 상기 식용유의 예로는 옥배유, 올리브유, 대두유, 홍화유, 면실유, 땅콩유, 호마유, 해바라기유 및 이들의 혼합물을 들 수 있다. 또한 필요에 따라 주사제 용액에는 분산제나 방부제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 미세입자의 분산액 제제는 주사제 또는 경구 투여용 제제로 사용될 수 있다.
- <30> 또한, 상기 미세입자의 분산액에 주사용 수용액을 가하여 수증유적형 에멀젼 (oil-in-water emulsion) 제제로 제조할 수 있다. 상기 주사용 수용액으로는 주사용 증

류수 및 주사용 완충용액이 있다. 이 경우, 미세입자 표면의 친유성 물질과 비수성 용액의 친화성으로 인해 미세입자 표면위에 비수성 용액이 코팅되는 특징을 가지며, 그 결과로 수중유적형 에멀젼이 형성되고 비수성 상에 약물이 함유된 고체상 미세입자들이 포함된 에멀젼이 얻어지므로 이 에멀젼은 주사제로 사용될 수 있다.

<31> 이러한 특성으로 인하여 본 발명의 미세입자는 기존의 앤럼 분산 수용액으로 제제화된 백신 제형과 함께 혼합 백신 제형으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 수용액상에서 앤럼에 흡착시킨 기존의 DTP 백신을 본 발명의 한 실시태양에 따라 B형 간염 표면 항원의 미세입자를 식용유에 분산한 분산액과 혼합할 경우 수중유적형 에멀젼이 형성되고 이 에멀젼의 수용액상에는 DTP 항원이 앤럼에 흡착되어 있고 기름상에는 고체상의 B형 간염 표면 항원이 존재한다. 이러한 수중유적형 에멀젼 제형에서는 서로 다른 2 종류의 항원이 각각 수용액상과 기름상내의 고체 입자안에 따로 존재하므로 이들 항원간의 원치 않는 상호작용을 막을 수 있다. 실제로 여러 항원을 한번에 수용액상의 앤럼에 흡착하는 혼합 백신 제형에서 항원들간의 상호작용 및 각 항원과 앤럼의 친화력 차이로 인하여 혼합 백신의 효과가 감소되며 재현성이 저하되는 문제가 있다.

<32> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만, 본 발명의 범위가 하기 실시예 만으로 한정되는 것은 아니다.

<33> 실시예 1: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 제조

<34> 인산 완충 수용액에 레시틴을 2%(w/v)의 농도로 가하고 완전히 수화시킨 후 여기에 재조합 B형 간염 표면 항원(LG 화학)을 최종 농도 0.5mg/ml가 되도록 가하여 최종 용액을 만들었다. 이 최종 용액을 분무건조기(BUCHI 191)에 0.55ml/분의 유량으로 공급하면서 분무 건조시켜 미세입자를 얻었다. 이때 건조 공기의 입구 온도는 70 °C였고 출구

온도는 50 °C였다. 얻어진 미세입자의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<35> 실시예 2: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 제조

<36> 재조합 B형 간염 표면 항원(LG 화학)이 0.5mg/ml의 농도로 용해되어 있는 인산 완충 수용액에 카르복시메틸셀룰로스를 3%(w/v)의 농도로 가하여 완전히 용해시킨 후 이 용액을 분무건조기(BUCHI 191)에 0.55ml/분의 유량으로 공급하면서 분무 건조시켜 일차 입자를 얻었다. 이때 건조 공기의 입구 온도는 70 °C였고 출구 온도는 50 °C였다.

<37> 이 일차 입자를 레시틴이 5%(w/v)의 농도로 용해된 에탄올에 5%(w/v)의 농도가 되도록 분산시킨 후 이 용액을 분무건조기(BUCHI 191)내에 1.0 ml/분의 유량으로 공급하면서 분무 건조시켜 최종 미세입자를 얻었다. 이때 건조 공기의 입구 온도는 85 °C였고 출구 온도는 50 °C였다. 얻어진 미세입자의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<38> 실시예 3: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 제조

<39> 인산 완충 수용액에 카르복시메틸셀룰로스를 3%(w/v)의 농도로 용해시킨 후 여기에 레시틴을 2%(w/v)의 농도로 가하고 완전히 수화시켰다. 이 용액에 재조합 B형 간염 표면 항원(LG화학)을 최종 농도 0.5mg/ml가 되도록 가하여 최종 용액을 만들었다. 이 최종 용액을 분무건조기(BUCHI 191)에 0.55ml/분의 유량으로 공급하면서 분무 건조시켜 미세입자를 얻었다. 이때 건조 공기의 입구 온도는 70 °C였고 출구 온도는 50 °C였다. 얻어진 미세입자의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<40> 실시예 4: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 제조

<41> 레시틴을 1%(w/v)의 농도로 사용한다는 점을 제외하고는, 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하여 B형 간염 표면 항원이 포함된 미세입자를 제조하였다. 제조된 미세입자

의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<42> 실시예 5: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 제조

<43> 레시틴을 0.5%(w/v)의 농도로 사용한다는 점을 제외하고는, 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하여 B형 간염 표면 항원이 포함된 미세입자를 제조하였다. 제조된 미세입자의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<44> 실시예 6: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 제조

<45> 카복시메틸셀룰로즈 대신에 하이드록시프로필셀룰로스를 사용한다는 점을 제외하고는, 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하여 B형 간염 표면 항원이 포함된 미세입자를 제조하였다. 제조된 미세입자의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<46> 실시예 7: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 제조

<47> 카복시메틸셀룰로즈 대신에 젤라틴을 사용한다는 점을 제외하고는, 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하여 B형 간염 표면 항원이 포함된 미세입자를 제조하였다. 제조된 미세입자의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<48> 실시예 8: 프리에스2 B형 간염 항원 함유 미세입자의 제조

<49> B형 간염 표면 항원 대신에 프리에스2 B형 간염 표면 항원(LG 화학)을 사용하여 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하여 프리에스2 B형 간염 표면 항원이 포함된 미세입자를 제조하였다. 제조된 미세입자의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<50> 실시예 9: 젖소 유방염 백신 미세입자의 제조

<51> B형 간염 표면 항원 대신에 재조합 SEC-SER 단백질(SEC1(스태필로코칼 엔테로톡신 C1 변이 단백질, Staphylococcal Enterotoxin C1 mutant protein); LG화학)이 2.16mg/ml

의 농도로 용해된 인산 완충 수용액을 단백질의 농도가 전체 성분의 합에 대해 6%(w/w)의 농도가 되도록 사용한다는 점을 제외하고는, 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하여, 젖소 유방염 백신 미세입자를 제조하였다. 제조된 미세입자의 크기는 직경 0.1 내지 5  $\mu\text{m}$ 였다.

<52> 실시예 10: 대장균 DNA 함유 미세입자의 제조

<53> 인산 완충 수용액에 카르복시메틸셀룰로스를 3%(w/v)의 농도로 용해시킨 다음 여과 멸균하고, 여기에 멸균된 레시틴을 2%(w/v)의 농도로 넣어 완전히 수화시킨 후, 대장균에서 추출한 DNA가 1mg/ml의 농도로 용해된 인산 완충 수용액을 DNA의 농도가 전체 성분의 합에 대해 6%(w/w)의 농도가 되도록 첨가한 다음 자석 교반기로 혼합하였다. 이 혼탁액을 분무건조기(BUCHI 191)에 0.55ml/분의 유량으로 공급하면서 분무건조시켜 미세입자를 얻었다. 이때 건조 공기의 입구 온도는 70 °C였고 출구 온도는 50 °C였다. 얻어진 미세입자의 크기는 직경 0.2 내지 3  $\mu\text{m}$ 였다.

<54> 실시예 11: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 면실유 분산액

<55> 실시예 3에서 제조된 B형 간염 표면 항원 함유 미세입자 20, 50, 100, 200, 500 mg을 각각 면실유 1 ml에 첨가하고 자석 교반기로 분산시켜 미세입자 농도가 각각 20, 50, 100, 200, 500mg/ml인 면실유 분산액을 제조하였다.

<56> 실시예 12: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 식용유 분산액

<57> 실시예 3에서 제조된 B형 간염 표면 항원 함유 미세입자 100 mg을 대두유, 옥배유, 호마유 각 1ml에 첨가하고 자석 교반기로 분산시켜 미세입자 농도가 100mg/ml인 대두유, 옥배유, 호마유 분산액을 제조하였다.

<58> 실시예 13: 프리에스2 B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 식용유 분산액

<59> 실시예 8에서 제조된 프리에스2 B형 간염 표면 항원 함유 미세입자 100mg을 면실유, 대두유, 옥배유, 호마유 각 1ml에 첨가하고 자석 교반기로 분산시켜 미세입자 농도가 100mg/ml인 면실유, 대두유, 옥배유, 호마유 분산액을 제조하였다.

<60> 실시예 14: 젖소 유방염 항원 함유 미세입자의 식용유 분산액

<61> 실시예 9에서 제조된 젖소 유방염 항원 함유 미세입자 100mg을 면실유, 대두유, 옥배유, 호마유 각 1ml에 첨가하고 자석 교반기로 분산시켜 미세입자 농도가 100mg/ml인 면실유, 대두유, 옥배유, 호마유 분산액을 제조하였다.

<62> 실시예 15: 대장균 DNA 항원 함유 미세입자의 식용유 분산액

<63> 실시예 10에서 제조된 대장균 DNA 함유 미세입자 100mg을 면실유, 대두유, 옥배유, 호마유 각 1ml에 첨가하고 자석 교반기로 분산시켜 미세입자 농도가 100mg/ml인 면실유, 대두유, 옥배유, 호마유 분산액을 제조하였다.

<64> 실시예 16: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 에멀젼 분산액

<65> 실시예 12에서 제조된, B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 농도가 100 mg/ml인 대두유, 옥배유, 호마유 분산액 각 1ml에 0.9% NaCl 수용액을 4ml씩 첨가하여, 식용유/물의 비가 1/4인 액상에 고체 입자 농도가 20 mg/ml가 되게 하였다. 최종 분산액을 손으로 흔들어 균질한 상의 백색의 불투명한 수증유적형 에멀젼 분산액을 제조하였다.

<66> 실시예 17: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 알럼 에멀젼 분산액

<67> 실시예 12에서 제조된, B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 농도가 100mg/ml인 대

두유, 옥배유, 호마유 분산액 각 1ml에 알럼(alum) 분산액을 4ml씩 첨가하여, 식용유/물의 비가 1/4인 액상에 고체 입자 농도가 20mg/ml가 되게 하였다. 최종 분산액을 손으로 흔들어 균질한 상의 백색의 불투명한 수증유적형 에멀젼 분산액을 제조하였다.

<68> 비교예 1: 레시틴이 포함되지 않은 미세입자의 제조

<69> 재조합 B형 간염 표면 항원(LG 화학)이 0.5mg/ml의 농도로 용해되어 있는 인산 완충 수용액에 카르복시메틸셀룰로스를 3%(w/v)의 농도로 완전히 용해시킨 후 분무건조기 (B CHI 191)에 0.55ml/분의 유량으로 공급하면서 분무 건조시켜 미세입자를 얻었다.

<70> 비교예 2: 비교예 1의 미세입자의 대두유 분산액

<71> 비교예 1에서 제조된 미세입자 100mg을 대두유 1ml에 첨가하고 자석 교반기로 분산시켜 미세입자 농도가 100mg/ml인 대두유 분산액을 제조하였다. 얻어진 미세입자들은 응집되어서 균질한 분산액을 완성하지 못하였다.

<72> 비교예 3: 비교예 2 분산액의 O/W 분산액

<73> 비교예 2에서 제조된 레시틴이 포함되지 않은 미세입자의 면실유 분산액 1ml에 주사용 생리식염수 4ml를 첨가하여 식용유/물의 비가 1/4인 액상에 고체 입자 농도가 20mg/ml가 되게 하였다. 최종 분산액을 손으로 흔들어 분산액을 제조하였다. 그러나, 이 분산액은 즉시 다시 상분리(phase separation)되어 균질한 에멀젼을 형성하지는 못하였으며 분산되지 않은 입자들이 응집되어 육안으로 관찰되었다.

<74> 시험예 1: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 안정성 시험

<75> 본 발명의 미세입자에 함유된 항원이 미세입자 제조전과 동일한 활성을 갖는지의 여부를 조사하기 위하여, 실시예 1 및 3에서 제조된 B형 간염 항원 함유 미세입자 시료

를 물에 재용해시켜 1,000 배 내지 100,000 배로 희석한 후 오자임 키트(AUSZYME kit, Abbott, USA)를 이용하여 B형 간염 항원의 활성을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

<76> 【표 1】

	제조 전 항원가(%)	제조 후 항원가(%)
실시예 1의 미세입자	89.5	86.7
실시예 3의 미세입자	88.6	82.3

<77> 표 1에서 보듯이, 본 발명의 미세입자에 함유된 항원은 미세입자 제조 후에도 그 활성을 동일하게 유지함을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 미세입자는 단백질 약물의 안정성을 유지한다.

<78> 시험 예 2: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 식용유 분산액의 주사능 시험

<79> 본 발명의 미세입자가 비수성 용액 또는 비수성 용액과 수용액의 혼합액에 균일하게 분산되는지를 정량적으로 평가하기 위하여, 본 발명의 분산액을 주사기로 주사할 때의 힘(주사능)을 측정하였다. 본 시험에서는 주사제가 충진되어 있는 주사기를 80mm/분의 일정 속도로 밀어줄 때 필요한 힘(주사능)을 측정하였다. 주사 바늘은 23 게이지(gauge)를 사용하였으며, 분산액 시료로는 인산 완충액으로 1/20 비율로 희석한 알림 분산액, 대두유, 실시예 12의 대두유 분산액, 실시예 17의 에멀젼 분산액, 비교예 2의 대두유 분산액 및 비교예 3의 에멀젼 분산액을 사용하였다. 이 분산액들에 대한 주사능은 하기 표 2에 나타내었다.

<80>

【표 2】

제형	입자 농도(mg/ml)	주사능(kgt)
알럼 분산액	0	0.1
대두유	0	0.5
실시예 12의 대두유 분산액	50	0.1
실시예 17의 에멀젼 분산액	20	0.5
비교예 2의 대두유 분산액	50	주사되지 않음
비교예 3의 에멀젼 분산액	20	주사되지 않음

<81> 표 2에서 보듯이, 본 발명의 미세입자의 비수성 용액 분산액은 주사하기에 용이하며, 본 발명의 미세입자는 레시틴이 함유되지 않은 경우(비교예 1)에 비해 월등히 비수성 용액에 대한 분산성이 우수하다는 것을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 미세입자의 비수성 분산액과 수용액의 에멀젼 분산액의 주사능은 대두유보다 낮기 때문에 혼합 제형으로 적용하기에도 용이하다.

<82> 시험예 3: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 동물 주사 시험

<83> 본 발명의 제형의 주사시의 생물학적 활성을 조사하기 위하여, 실시예 3에서 제조된 B형 간염 표면 항원 함유 미세입자 시료를 대두유에  $0.5\mu\text{g}$  단백량/ml,  $0.125\mu\text{g}$  단백량/ml,  $0.03125\mu\text{g}$  단백량/ml,  $0.0078\mu\text{g}$  단백량/ml이 되도록 첨가하고 분산시켜 실험군으로 하고, 기존의 알럼을 면역보조제로 사용한 B형 간염 백신(LG화학, 의약품 사업부)을 인산 완충액으로  $0.5\mu\text{g}$  단백량/ml,  $0.125\mu\text{g}$  단백량/ml,  $0.03125\mu\text{g}$  단백량/ml,  $0.0078\mu\text{g}$  단백량/ml이 되도록 희석한 것을 비교군으로 하여, 4주령 수컷 Balb/C(H-2d) 마우스에 각 용량당 10 마리씩 복강 주사하여 면역시키고 주사한 지 4주후에 면역된 마우스로부터 혈액을 채취하였다. 이 혈액으로부터 혈청을 분리하여 오샵 EIA 키트(AUSAB EIA kit, Abbott, USA)를 사용하여 B형 간염 항원에 대해 특이적인 항체의 역가와 항체생성률(%)

을 구한 다음 통계적인 방법(프로빗 분석법)을 이용하여 미세입자의 반수 유효 농도( $ED_{50}$ )를 구하여 하기 표 3에 나타내었다.

<84> 【표 3】

투여 용량 미세입자	0.5 $\mu\text{g}$	0.125 $\mu\text{g}$	0.0312 $\mu\text{g}$	0.0078 $\mu\text{g}$	$ED_{50}$ 값( $\mu\text{g}$ )
실시예 3의 미세입자	106.35	38.93	13.32	4.68	0.0121
비교 제형	12.43	6.1	4.32	3.15	0.1504

<85> 표 3에서 보듯이, 본 발명의 미세입자는 기존의 알럼을 면역보조제로 사용한 경우 보다 훨씬 작은  $ED_{50}$ 값을 나타내었으며, 동량의 항원을 접종하는 경우에도 기존의 제형 보다 훨씬 큰 항체 역가를 나타내었다. 따라서, 본 발명의 미세입자는 기존의 앤럼 제형보다 항체 형성능력에 있어서 생체내에서 더 우수한 효과를 나타내는 면역보조제(adjuvant)로서 기능한다는 것을 알 수 있다.

<86> 시험예 4: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 동물 경구 투여 시험

<87> 본 발명의 미세입자의 경구 투여시의 생물학적 활성을 조사하기 위하여, 실시예 3에서 제조된 B형 간염 표면 항원 함유 미세입자 시료를 대두유에 5 $\mu\text{g}$  단백량/ml이 되도록 첨가하고 분산시켜 실험군으로 하고, 기존의 알럼을 면역보조제로 사용한 B형 간염백신(LG화학, 의약품 사업부)을 인산 완충액으로 5 $\mu\text{g}$  단백량/ml이 되도록 희석한 것을 비교군으로 하여, 4주령 수컷 Balb/C(H-2d) 마우스에 각 용량당 10마리씩 경구 투여하여 면역시키고 투여한지 2주, 4주째에 추가로 동량의 단백량을 경구 투여한 다음 최초 접종 일로부터 8주째에 면역된 마우스로부터 혈액을 채취하였다. 이 혈액으로부터 혈청을 분

리하여 오샵 EIA 키트(Abbott, USA)를 사용하여 B형 간염 항원에 대해 특이적인 항체의 역가와 항체생성률(%)을 구하여 하기 표 4에 나타내었다.

<88> 【표 4】

	항체생성률 (%)	항체 역가 (mIU/ml)
실시예 3의 미세입자	80	10.1
비교 제형	0	0

<89> 표 4에서 보듯이, 본 발명의 미세입자가 경구 투여된 마우스는 80%의 항체 생성률을 나타내는데 반해 기존의 알럼을 면역보조제로 사용한 백신 제형이 경구 투여된 마우스에는 항체가 전혀 생성되지 않았다. 이로부터 본 발명의 미세입자는 경구 투여시 항원 단백질을 보다 효율적으로 체내에 전달하여 기존 제형보다 항체 형성능력에 있어서 생체내에서 더 우수한 효과를 나타내므로, 경구 백신 제형으로도 적용할 수 있음을 알 수 있다.

<90> 시험예 5: B형 간염 표면 항원 함유 미세입자의 동물 시험

<91> 본 발명의 미세입자가 세포성 면역 반응(cell-mediated immune response)을 유도하는지를 조사하기 위해, 실시예 3에서 제조된 B형 간염 표면 항원 함유 미세입자 시료를 대두유에 10  $\mu\text{g}$  단백량/ml가 되도록 첨가하고 분산시킨 제형(실험군) 및 시판되는 알럼 흡착 B형 간염 백신(LG 화학)을 항원 단백질 함량으로 10  $\mu\text{g}$ 이 되도록 인산 완충액으로 희석한 제형(비교군)을 각각 4주령 암컷 Balb/C(H-2d) 마우스에 피하주사하여 면역시키고 2주 간격으로 동일한 제형으로 2번 추가 접종한 다음 3차 접종 2주후에 쉬름벡 등의 방법(Schirmbeck, R. et al.

*J. Virol.* 68, 1418-1425 (1994))에 따라 면역된 마우스로부터 비장 세포(pre CTL)를 얻고 이를 배양하여 얻은 CTL 세포를 효과 세포(Effecter cell; E)로 사용하고 효과 세포와 목표 세포(Target cell; T)의 비율을 달리하면서 함께 배양하여 세포성 면역 반응중 CTL 활성을 검정하였다. 특이적 살상력(specific lysis, %)은 하기 수학식에 의해 결정하였으며, 그 결과를 표 5에 나타내었다.

## &lt;92&gt; 【수학식 1】

$$\text{특이적 살상력} (\%) = \frac{(\text{시료의 cpm} - \text{자연적 방출 cpm})}{(\text{최대 방출 cpm} - \text{자연적 방출 cpm})} \times 100$$

## &lt;93&gt; 【표 5】

특이적 살상력, %

E : T	20 : 1	5 : 1	1 : 1
제형			
실시예 3의 미세입자 제형	20 %	8 %	2 %
비교 제형	2 %	1 %	2 %

<94> 표 5의 결과에서, CTL에 의한 목표 세포에 대한 특이적인 파괴 수치(특이적 살상력)가 높을수록 세포성 면역 반응이 활발하게 유도되었다는 것을 의미하는데, 본 발명의 미세입자를 사용한 경우에는 세포성 면역 반응이 활발하게 일어난데 반해 비교군에서는 세포성 면역 반응이 거의 일어나지 않았음을 보여준다. 이 결과는 본 발명의 미세입자가 항체 형성을 유도하는 체액성 면역(humoral immune response)뿐 아니라 세포성 면역도 유도하는 효과적이고 강력한 면역보조제로서 기능한다는 것을 의미한다.

<95> 시험예 6: 젖소 유방염 항원 함유 미세입자의 동물 시험

<96> 본 발명의 젖소 유방염 백신이 투여된 젖소의 면역 증강 효과를 검증하기 위하여, 실시예 9에서 제조된 소 유방염 백신 미세입자 시료를 대두유에 4.0mg 단백량/ml 대두유가 되도록 첨가하여 분산시킨 제형(실험군), SEC-SER 항원을 상용 시판되는 면역보조제 ISA와 제조사의 방법대로 혼합한 비교 제형을 역시 4.0mg 단백량/ml가 되도록 희석한 제형(비교군), 및 실시예 9와 같은 방법으로 제조하되 소 유방염 항원을 넣지 않은 제형을 대두유에 분산시킨 제형(대조군)을 각각 체세포수가 높은 2-3차 산의 비유기 젖소 5마리씩에 근육 주사하여 최초 면역시킨 다음 최초 접종일로부터 2주, 4주후에 동량의 단백량을 추가 접종하였다. 젖소에서의 생체내 효과를 확인하기 위하여 접종 전과 최초 접종일로부터 2주, 6주, 10주, 14주째에 혈액을 채취하여 혈액내 항체 역가의 변화를 관찰하였다. 그 결과를 ELISA 리더(reader)의 결과치로 하기 표 6에 나타내었다.

<97> 【표 6】

	접종 전	2주	6주	10주	14주
비교군	1	2.552	2.677	2.466	2.322
실험군	1	4.472	5.123	5.911	4.522
대조군	1	1.335	1.486	2.002	2.278

<98> 표 6에서 보듯이, 실험군에서 가장 높은 항체 형성능을 보였으며 이러한 높은 항체 수준은 1차 접종후 14주까지 지속되었다. 따라서, 본 발명의 제형은 동물용 백신으로도 적용이 가능함을 알 수 있다.

### 【발명의 효과】

<99> 본 발명의 미세입자는 수용성 항원을 포함하는 고체상 입자가 친유성 물질로 피복

1019990059776

2000/7/1

됨으로써 수용성 항원의 활성을 유지하면서 항원을 체내에 효과적으로 전달하여 우수한 항체 형성능을 나타낸다. 또한 본 발명의 미세입자는 비수성 용액 및 비수성 용액과 수용액에 대한 분산성이 우수하여 주사제 또는 경구 투여용 제제로 사용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

수용성 항원을 포함하는 고체상 입자가 친유성 물질로 피복된 평균 0.1 내지 200  $\mu\text{m}$  크기를 갖는 고체상 미세입자.

**【청구항 2】**

제 1 항에 있어서,

상기 미세입자의 평균 입경이 1 내지 10  $\mu\text{m}$ 인 미세입자.

**【청구항 3】**

제 1 항에 있어서,

상기 항원이 아데노바이러스 타입 4&7, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인플루엔자 A & B 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 홍역 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 풍진 바이러스, 소아마비 바이러스, 공수병 바이러스, 수두 바이러스, 황열 바이러스 또는 인간면역결핍 바이러스로부터 유래된 정제 항원, 재조합 항원, 생 바이러스, 약독화된 바이러스, 죽은 바이러스 항원 및 이들의 혼합 항원; 보데텔리아 페투시스(*Bordetella pertussis*), 보렐리아 바그도페리(*Borrelia burgdorferi*), 장독소 대장균(enterotoxigenic *E. coli*), 헤모필러스 인플루엔자 타입 b(*Haemophilus influenzae* type b(Hib)), 마이코박테리움 레프레(*Mycobacterium leprae*), 마이코박테리움 투버클로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 네이세리아 메닌기티디스 A & C(*Neisseria meningitidis* A & C), 네이세리아 메닌기티디스 B, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 세파시아(*Pseudomonas cepacia*), 살모넬라 타이

피(*Salmonella typhi*), 시겔라 종(*Shigella spp.*) 스트렙토코커스 뉴모니아() 또는 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)로부터 유래된 병원체 전체 또는 일부, 독소 또는 이들의 혼합 항원; 코키디오데스 이미티스(), 레이쉬마니아 종(*Leishmania sp.*), 플라스모디움 종(*Plasmodium sp.*)으로부터 유래된 병원체 전체 또는 일부, 또는 이들의 혼합 항원; 소기종저, 소 유행열, 소 탄저병, 소 아까바네병, 소 구제역, 소 유방염, 소 전염성비기관염, 소 바이러스성설사증, 소 전염성위장염, 돼지 콜레라, 돼지 유행성설사증, 돼지 위축성비염, 돼지 파보바이러스 병, 돼지 로타바이러스성 장염, 닭 뉴캣슬병, 닭 마렉병, 닭 뇌척수염, 광견병, 개 디스템퍼, 개 파보바이러스성 장염, 개 코로나바이러스 병 또는 개 전염성 간염 백신에 사용되는 항원 또는 이들의 혼합 항원; 또는 병원체에서 추출한 DNA, RNA, 플라스미드, CpG DNA 또는 올리고뉴클레오타이드인 미세입자.

#### 【청구항 4】

제 1 항에 있어서,

상기 친유성 물질이 지질 및 이의 유도체, 지방산 및 이의 유도체, 왁스, 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택된 것인 미세입자.

#### 【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

상기 지질 및 이의 유도체가 레시틴, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린 또는 포스파티딜이노시톨, 아라키도일 포스파티딜콜린 또는 스테아로일 포스파티딜콜린인 미세입자.

**【청구항 6】**

제 4 항에 있어서,

상기 지방산 및 이의 유도체가 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 글리세릴 스테아레이트, 소르비탄 팔미테이트, 소르비탄 스테아레이트, 소르비탄 모노올레이트 또는 폴리스로베이트인 미세입자.

**【청구항 7】**

상기 고체상 입자가 수용성 부형제를 추가로 포함하는 미세입자.

**【청구항 8】**

제 7 항에 있어서,

상기 수용성 부형제가 탄수화물, 단백질, 아미노산, 지방산, 무기염, 계면활성제, 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택된 것인 미세입자.

**【청구항 9】**

제 1 항의 고체상 미세입자를 비수성 용액에 분산시켜 제조된 분산액 제제.

**【청구항 10】**

제 9 항에 있어서,

상기 비수성 용액이 식용유, 미네랄 오일, 스쿠알렌, 스쿠알란, 대구 간유, 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드 또는 이들의 혼합물인 제제.

**【청구항 11】**

제 10 항에 있어서,

상기 식용유가 옥배유, 올리브유, 대두유, 홍화유, 면실유, 땅콩유, 호마유, 해바라기유 또는 이들의 혼합물인 제제.

【청구항 12】

제 9 항에 있어서,

분산제 또는 방부제를 추가로 포함하는 제제.

【청구항 13】

제 9 항에 있어서,

주사용 또는 경구 투여용으로 사용되는 제제.

【청구항 14】

제 9 항의 제제에 주사용 수용액을 첨가하여 제조된 수중유적형 에멀젼 제제.

【청구항 15】

제 14 항에 있어서,

상기 주사용 수용액이 주사용 증류수 또는 주사용 완충용액인 제제.

【청구항 16】

제 14 항에 있어서,

상기 주사용 수용액에 다른 종류의 항원을 추가로 포함하는 제제.